

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-170998

(43) 公開日 平成7年(1995)7月11日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/37		6807-4B		
A 6 1 K 38/55	A B A			
C 1 2 N 15/09				
		9281-4B	A 6 1 K 37/ 64	A B A
			C 1 2 N 15/ 00	A
			審査請求 未請求 請求項の数30	O L (全 17 頁)

(21) 出願番号 特願平6-214108

(22) 出願日 平成6年(1994)9月7日

(31) 優先権主張番号 08/117863

(32) 優先日 1993年9月7日

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(31) 優先権主張番号 08/299401

(32) 優先日 1994年9月1日

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 592169334

イッサム・リサーチ・ディベロップメン
ト・カンパニー・オブ・ザ・ヘブル・ユ
ニバーシティ・オブ・エルサレム
YISSUM RESEARCH DEV
ELOPMENT COMPANY OF
THE HEBREW UNIVERS
ITY OF JERUSALEM
イスラエル国、エルサレム、ビー・オー・
ボックス 4279、ヤボチンスキー・ストリ
ート 46

(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 NF- κ Bの調節方法

(57) 【要約】

【目的】 I κ B α プロテアーゼの特異的阻害物質を同定する方法を提供する。

【構成】 I κ B α の分解に影響する組成物を同定する方法であって、該組成物、リン酸化 I κ B α 、及びキモトリプシン様セリンプロテアーゼを含む成分をこれら成分が相互作用するのに十分な条件でインキュベートし；そして該組成物により生ずるこれらプロテアーゼへの作用を測定することを含む方法。

BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

【請求項1】 $I\kappa B\alpha$ の分解に影響する組成物を同定する方法であって、

a) 該組成物、リン酸化 $I\kappa B\alpha$ 、及びキモトリプシン様セリンプロテアーゼを含む成分をこれら成分が相互作用するのに十分な条件でインキュベートし；そして

b) 該組成物により生ずるこれらプロテアーゼへの作用を測定することを含む方法。

【請求項2】 更に $NF-\kappa B$ を含む、請求項1記載の方法。

【請求項3】 $I\kappa B\alpha$ が $NF-\kappa B$ に結合している、請求項2記載の方法。

【請求項4】 キモトリプシン様セリンプロテアーゼがキモトリプシンである、請求項1記載の方法。

【請求項5】 作用が該プロテアーゼの阻害である、請求項1記載の方法。

【請求項6】 作用が該プロテアーゼの刺激である、請求項1記載の方法。

【請求項7】 $I\kappa B\alpha$ の分解に影響する組成物を同定する方法であって、

a) 該組成物、 $NF-\kappa B$ の誘発物質、及び指示細胞を含む成分をインキュベートし；そして

b) $NF-\kappa B$ 活性を検出することを含む方法。

【請求項8】 指示細胞が少なくとも1つの κB 結合モチーフのコピーを含有するように組換え技術により修飾されている、請求項7記載の方法。

【請求項9】 κB 結合モチーフがリポーター遺伝子に機能できるように連結されている、請求項8記載の方法。

【請求項10】 リポーター遺伝子が、ペニシリナーゼ、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ (CAT)、アデノシンデアミナーゼ (ADA)、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ (neo, G418)、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR)、ヒグロマイシン-B-ホスホトランスフェラーゼ (HPH)、チミジンキナーゼ (TK)、 β -ガラクトシダーゼ (β -gal)、及びキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ (XGPR T) からなる群から選ばれる、請求項9記載の方法。

【請求項11】 被験体における $NF-\kappa B$ 遺伝子活性化に関連する免疫異常障害を治療する方法であって、 $I\kappa B\alpha$ を分解するキモトリプシン様セリンプロテアーゼの阻害物質を該被験体に治療有効量投与することを含む方法。

【請求項12】 阻害物質がペプチドアルデヒドである、請求項11記載の方法。

【請求項13】 ペプチドアルデヒドが式：



【式中、 R_1 は任意のアミン保護基であり； L はロイシンであり； R_2 は任意であるが式 $-(CH_2)_n -CH$

$(NH_3^+) COO^-$ (n は1~5で $(CH_2)_n$ は分枝状又は直鎖状のアルキルである) を有し；そして R_3 はメチオニンを除く任意の疎水性アミノ酸である。】を有する、請求項12記載の方法。

【請求項14】 R_3 が、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン及びフェニルアラニンからなる群から選ばれる、請求項13記載の方法。

【請求項15】 アミン保護基が N -アセチル、ベンジルオキシカルボニル及びブチルからなる群から選ばれる、請求項13記載の方法。

【請求項16】 ペプチドアルデヒドが、 N -アセチル- $Leu-Leu$ -ノルロイシナール ($AcLLnL$)、 N -アセチル- $Ala-Leu-Leu$ -ノルロイシナール ($AcALLnL$)、及びベンジルオキシカルボニル- $Leu-Leu$ -フェニルアラニナール ($ZLLF$) からなる群から選ばれる、請求項13記載の方法。

【請求項17】 免疫異常障害が、後天性免疫不全症 (エイズ)、毒物ショック症候群、同種異系移植片拒絶反応、紫外線及び放射線反応、及び進行癌に関連する悪液質からなる群から選ばれる、請求項11記載の方法。

【請求項18】 $NF-\kappa B$ トランス活性化に関連するウィルスの活性化を調節する方法であって、 $I\kappa B\alpha$ を分解するキモトリプシン様セリンプロテアーゼの阻害物質を被験体に調節有効量投与することを含む方法。

【請求項19】 ウィルスがヒト免疫不全ウィルス (HIV) である、請求項18記載の方法。

【請求項20】 阻害物質がペプチドアルデヒドである、請求項18記載の方法。

【請求項21】 ペプチドアルデヒドが式：



【式中、 R_1 は任意のアミン保護基であり； L はロイシンであり； R_2 は任意であるが式 $-(CH_2)_n -CH(NH_3^+) COO^-$ (n は1~5で $(CH_2)_n$ は分枝状又は直鎖状のアルキルである) を有し；そして R_3 はメチオニンを除く任意の疎水性アミノ酸である。】を有する、請求項20記載の方法。

【請求項22】 R_3 が、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン及びフェニルアラニンからなる群から選ばれる、請求項21記載の方法。

【請求項23】 アミン保護基が N -アセチル、ベンジルオキシカルボニル及びブチルからなる群から選ばれる、請求項21記載の方法。

【請求項24】 ペプチドアルデヒドが、 N -アセチル- $Leu-Leu$ -ノルロイシナール ($AcLLnL$)、 N -アセチル- $Ala-Leu-Leu$ -ノルロイシナール ($AcALLnL$)、及びベンジルオキシカルボニル- $Leu-Leu$ -フェニルアラニナール ($ZLLF$) からなる群から選ばれる、請求項21記載の方法。

【請求項25】 $I\kappa B\alpha$ を分解するキモトリプシン様セリンプロテアーゼの阻害物質を治療有効量含む医薬組成物。

【請求項26】 阻害物質がペプチドアルデヒドである、請求項25記載の医薬組成物。

【請求項27】 ペプチドアルデヒドが式：



【式中、 R_1 は任意のアミン保護基であり； L はロイシンであり； R_2 は任意であるが式 $-(CH_2)_n -CH(NH_3^+)COO^-$ (n は1~5で $(CH_2)_n$ は分枝状又は直鎖状のアルキルである)を有し；そして R_3 はメチオニンを除く任意の疎水性アミノ酸である。】を有する、請求項26記載の医薬組成物。

【請求項28】 R_3 が、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン及びフェニルアラニンからなる群から選ばれる、請求項27記載の医薬組成物。

【請求項29】 アミン保護基が N -アセチル、ベンジルオキシカルボニル及びブチルからなる群から選ばれる、請求項27記載の医薬組成物。

【請求項30】 ペプチドアルデヒドが、 N -アセチル- $Leu-Leu$ -ノルロイシナール ($AcLLnL$)、 N -アセチル- $Ala-Leu-Leu$ -ノルロイシナール ($AcALLnL$)、及びベンジルオキシカルボニル- $Leu-Leu$ -フェニルアラニナール ($ZLLF$) からなる群から選ばれる、請求項27記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、一般的には、遺伝子発現の調節の分野に関し、具体的には、 $NF-\kappa B$ 阻害物質、つまり $I\kappa B\alpha$ の分解の調節による転写因子 $NF-\kappa B$ の調節に関する。

【0002】

【従来の技術】核因子- κB ($NF-\kappa B$)は、フォールボールエステル、リポ多糖類 (LPS)、インターロイキン-1 ($IL-1$) 及び腫瘍壊死因子 α の如き因子で細胞を処理した後の複数の細胞性遺伝子の調節に関与する誘発性転写因子である。これら遺伝子は、免疫、急性期及び炎症反応のごく初期の過程に関係している。 $NF-\kappa B$ は、幾つかのウィルスの転写活性化にも関係しており、1型ヒト免疫不全ウィルス ($HIV-1$) に最も顕著である (ナーベル (Nabel) ら, *Nature*, 326:711, 1987 ; カウフマン (Kaufman) ら, *Mol. Cell. Biol.*, 7:3759, 1987)。

【0003】 $NF-\kappa B$ は、十量体シス作用 κB DNAモチーフに結合して、それによる遺伝子発現を調節する二量体転写因子である。伝統的には、 $p50/p65$ ヘテロ二量体が $NF-\kappa B$ と言われ、その始原的で最も豊富な型を残しているが、最近、明確に異なるが密接に関連する幾つかのホモ及びヘテロ二量体因子が κB 部位

依存性DNA結合活性及びその調節を司っていることが認識されてきた。これら種々の二量体因子は、 Rel 関連ポリペプチドのファミリーのメンバーから構成される。前駆体からのそのタンパク質分解プロセッシング及び認識された活性化ドメインの欠如により区別されるこのファミリーの1つのサブクラスは、 $p50$ ($NFKB1$) 及び $p50B$ ($NFKB2$, $p52$) を包含するのに対して、第2サブクラスは、認識された活性化ドメインを含有し、 $p65$ ($RelA$)、 $RelB$ 、 $c-Rel$ 、 $v-Rel$ 、及びショウジョウバエタンパク質ドーサル (*Drosophila protein Dorsal*) を包含する。全ての Rel 関連メンバーは、 Rel 相同ドメインと呼ばれる、DNA結合及び二量化を司る相同性の300アミノ酸領域を共に有している。細胞質では、 $NF-\kappa B$ と Rel タンパク質は“ Rel 複合体”を形成する。

【0004】 $NF-\kappa B$ 転写因子及び種々の関連型の活性化は、 $TNF\alpha$ 、フォールボール-12-ミリスレート-13-アセテート (PMA)、インターロイキン-1 ($IL-1$) 及びインターロイキン-2 ($IL-2$) を含む様々な物質によって開始される。活性化は翻訳後に起こる事象によって進行し、 Rel 複合体内の生成細胞質 $NF-\kappa B$ が細胞質抑制タンパク質、つまり $I\kappa B\alpha$ から放出される。 $I\kappa B\alpha$ は、 $p50/p65$ ヘテロ二量体のトランス活性化を $p65$ 成分への結合により阻害して、該二量体の核への移行を遮断する。 $I\kappa B\alpha$ は、 $c-Rel$ 又は $RelB$ を含有する複合体も阻害する。 $I\kappa B\alpha$ は、DNA内の κB 結合部位への種々の $NF-\kappa B$ 二量体の結合を *in vitro* で遮断する。

【0005】 $NF-\kappa B$ の核局在化のフォールボールエステル及び $TNF\alpha$ 誘発は、生成 $I\kappa B\alpha$ の分解及び $I\kappa B\alpha$ 遺伝子発現の活性化の両方に関係している。トランスフェクションの研究により、 $I\kappa B\alpha$ 遺伝子が、 $NF-\kappa B$ の65キロダルトン転移活性化サブユニットによって特異的に誘発されることが示されている (サン (Sun) ら, *Science*, 259:1912, 1993)。合成されたばかりの $I\kappa B\alpha$ の $p65$ との会合は、 $NF-\kappa B$ -DNA結合活性の細胞内阻害を復活させ、この不安定な阻害物質の存続を長引かせる。これら研究は、 $NF-\kappa B$ が誘発性自己調節経路により $I\kappa B\alpha$ の発現を制御していることを示す。

【0006】 $NF-\kappa B$ 遺伝子調節は、後天性免疫不全症 (エイズ) の進行、急性期反応及び毒物ショックの間の免疫及び内皮細胞の活性化、同種異系移植片拒絶反応、及び放射線反応を含む多くの異常事象に関係している。最近、無細胞実験により、 $I\kappa B\alpha$ リン酸化がその不活性化及び阻害物質の放出にある役割を果たしているという可能性が言及されており (ゴーシュ (Ghosh) ら, *Nature*, 344:678, 1990)、一時的な $I\kappa B\alpha$ リン酸化が *in vivo* 活性化研究において個別的に観察されている (ブラウン (Brown) ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*

A., 90:2532, 1993; ベグ(Beg) ら, J. Mol. Cell. Bio. l., 13:3301, 1993)。驚いたことに、本発明は、Re l 複合体から I κ B α を解離させるのは I κ B α のリン酸化でなく、リン酸化はそれにタンパク質分解を受け易くさせるということを初めて明白に証明するものである。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】従って、I κ B α プロテアーゼの性質の特定は、抗炎症剤及び免疫抑制剤として有効であろう該プロテアーゼの特異的阻害物質の同定に重要である。本発明は、かかる阻害物質を同定する方法を提供し、一群の阻害物質も提供する。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明は、I κ B α の分解を司っている酵素は、リン酸化 I κ B α を認識するキモトリプシン様セリンプロテアーゼであるという独創的な発見に基づくものである。この知見の故に、本発明は、I κ B α の分解に影響する組成物を同定する方法であって、該組成物、I κ B α 、及びキモトリプシン様セリンプロテアーゼを含む成分をこれら成分が相互作用するのに十分な条件でインキュベートし、そして該組成物により生ずるこれらプロテアーゼへの作用を測定することを含む方法を提供する。本発明は、I κ B α の分解に影響する組成物を同定する方法であって、該組成物、NF- κ B の誘発物質、及び指示細胞を含む成分をインキュベートし；そしてNF- κ B 活性を検出することを含む方法も提供する。

【0009】また、本発明は、被験体におけるNF- κ B 遺伝子活性化に関連する免疫異常障害を治療する方法であって、I κ B α を分解するキモトリプシン様セリンプロテアーゼの阻害物質を該被験体に治療有効量投与することを含む方法も提供する。図1 a は、70 Z / 3 プレB細胞内のI κ B α に対するフォルボール-12-ミリスレート-13-アセテート(PMA)処理の作用のウェスタンブロット分析を示す。

【0010】図1 b は、マウス κ 軽鎖エンハンサーのNF- κ B 結合モチーフを包含する³²P 標識DNAをプローブにしたPMA処理70 Z / 3 プレB細胞からのDNAのオートラジオグラムを示す。図2 は、70 Z / 3 細胞及びHe L a 細胞におけるNF- κ B の活性化及びI κ B α の安定性に対するIL-1、LPS及びTNF処理の作用を示す。ウェスタンブロット及びEMSA (天然ゲルからのフルオログラム) を示す。

【0011】図3 は、PMA刺激後の70 Z / 3 細胞におけるI κ B α の安定性及びNF- κ B の活性化に対するシクロヘキサミドの作用のEMSA (上方のパネル) 及びウェスタンブロット (下方のパネル) を示す。図4 は、シクロヘキサミド単独で処理 (左側のパネル) 又はシクロヘキサミドで1時間前処理した後に所定時間PMAで処理 (右側のパネル) した細胞のウェスタンブロッ

ト分析後のI κ B α デンシトメトリでの定量を示す。

【0012】図5 a は、70 Z / 3 細胞におけるNF- κ B の活性化及びI κ B α の安定性に対するPMAによる誘発でのp-トシル-L-フェニルアラニクロロメチルケトン (TPCK) の作用を示す。図5 b 及びc は、70 Z / 3 細胞におけるIL-1、LPS及びPMAによるNF- κ B の活性化へのTPCKの作用を示す。

【0013】図6 は、70 Z / 3 細胞におけるNF- κ B の活性化及びI κ B α の安定性に対するピロリジンジチオカルバメート (PDTC) の作用を示す。図7 a は、HIV-LTR-Luc活性により測定したNF- κ B 活性を示す。ジャーカット細胞を次の試薬で刺激した：(P), PMA (フォルボール-12-ミリスレート-13-アセテート), 10 ng / ml ; (I), A 23187 Ca⁺⁺イオノファ, 1 μ M ; (3), 抗CD3 (OKT3), 5 μ g / ml ; (28) 抗CD28 (モノクローナル抗体9.3), 3 μ g / ml ; (P / I), I κ B α をトランスフェクトしたジャーカット細胞にPMA + Ca⁺⁺イオノファ ; (NS) 刺激せず (0.1%, DMSOのみ)。

【0014】図7 b は、NF- κ B 活性への種々の刺激の作用の電気泳動移動度シフト検定法 (EMSA) を示す。図7 c は、種々の刺激を細胞に与えた後のI κ B α のリン酸化を示すウェスタンブロットである。図8 a は、PMA + Ca⁺⁺イオノファ (P / I) 刺激後のI κ B α の修飾の速度を示す。

【0015】図8 b は、NF- κ B 遮断物質であるTPCK、PDTC及びCsAで細胞を処理した後のI κ B α 分解を示す。図9 a は、N-アセチル-L-leu-L-leu-ノルロイシナル (AcLLnL) で処理した細胞のEMSA及びI κ B α リン酸化及び分解への作用を示す。図9 b は、AcLLnL処理後の数時点のEMSA及びNF- κ B 活性への作用を示す。

【0016】図9 c は、細胞のAcLLnL処理後のRelA及びI κ B α の免疫沈降のウェスタンブロット分析を示す。図10 は、細胞のTNF α 、IL-1又はPMA刺激後のI κ B α 分解への種々のペプチドアルデヒド阻害物質の作用を示す。図11 は、NF- κ B プロモーターへの種々のペプチドアルデヒド阻害物質の作用を示す。

【0017】図12 は、ベンジルオキシカルボニル-L-leu-L-leu-フェニルアラニナル (ZLLF) 及びAcLLnLのNF- κ B DNA結合及びI κ B α 分解の用量-応答のEMSA及びウェスタンブロットを示す。

【0018】本発明は、I κ B α の分解に影響する組成物を同定する方法を提供する。この方法は、該組成物、I κ B α 、及びキモトリプシン様セリンプロテアーゼを含む成分をこれら成分が相互作用するのに十分な条件で

インキュベートし、そして該組成物により生ずるこれらプロテアーゼへの作用を測定することによって行うことができる。

【0019】このNF- κ B転写因子複合体は、抑制タンパク質I κ B α によって細胞質内にとどまっている。種々の細胞性刺激が、殆ど知られていないメカニズムによってこの抑制を解き、NF- κ Bの核への局在化及びその標的遺伝子の転移活性化を招来する。かくして、NF- κ BとI κ B α は、厳格に制御された調節メカニズムに関連している。

【0020】本発明は、キモトリプシン様セリンプロテアーゼのようなI κ B α を分解するプロテアーゼ及び該プロテアーゼの阻害物質を記載している。本発明によれば、I κ B α プロテアーゼがキモトリプシン様セリンプロテアーゼであるという驚くべき発見が、該プロテアーゼに影響する組成物のための有用なスクリーニング手段を提供する。

【0021】かくして、本発明は、該プロテアーゼを阻害又は刺激する等によりI κ B α の分解に影響し、従って抗炎症剤及び免疫抑制剤として有効であり得る組成物を同定する方法を提供する。この方法は、試験すべき該組成物、リン酸化I κ B α 及び該プロテアーゼを含む成分を、これら成分が相互作用するのに十分な条件でインキュベートした後で、該プロテアーゼへの該組成物の作用を測定することを含む。観察されるプロテアーゼへの作用は、阻害性であっても刺激性であってもよい。例えば、プロテアーゼを阻害する組成物は、該プロテアーゼがI κ B α を分解するのを阻害し、それによってNF- κ Bが核に移行するのを妨げて、NF- κ Bによる遺伝子の転移活性化を阻害するであろう。該組成物が有するI κ B α の安定性に対する効果は、免疫学的、核酸及びタンパク質分析法を含む種々の方法によって確認することができる。I κ B α の結末を確認できるようにI κ B α を標識してもよい。標識の例には、放射性同位元素、蛍光化合物、生物発光化合物、化学発光化合物、金属キレート化剤又は酵素が含まれる。当業者は、日常の実験法を用いてそうしたものを確かめることができるだろう。

【0022】I κ B α の分解に影響する組成物を同定するための本発明の方法は、好ましくはI κ B α と結合又は複合化したNF- κ Bの添加を更に含めることができる。I κ B α を分解するキモトリプシン様セリンプロテアーゼは、キモトリプシンであってもよい。刺激後にI κ B α を分解することができる候補の細胞質プロテアーゼは、キモトリプシン様活性を有し、至る所に存在する700kDの多サブユニットプロテオソームである（ビニトスキイ（Vinitsky）ら、Biochemistry, 31:9421, 1992）。ここに記載するプロテオソームは、多触媒性酵素複合体である。

【0023】本発明は、I κ B α の分解に影響する組成

物を同定する方法であって、試験すべき組成物、NF- κ Bの誘発物質、及び指示細胞を含む成分をインキュベートし；そしてNF- κ B活性を検出することを含む方法も包含する。NF- κ Bの誘発物質は、試験すべき組成物の添加の前に添加しても後に添加してもよい。好ましくは、組成物を添加した後にそれを添加する。NF- κ Bの誘発物質には、IL-1、IL-2、TNF α 、フォルボールエステル及びLPSが含まれる。当業者は、他の誘発物質を知っているだろう。

10 【0024】本発明の方法は指示細胞内で行われる。

“指示細胞”とは、NF- κ Bの活性化を検出できる細胞のことである。哺乳動物の宿主指示細胞の例には、プレB細胞系、70Z/3、ジャーカット（Jurkat）T、COS、BHK、293、CHO、He pG2、及びHeLa細胞が含まれる。NF- κ Bのレベルを検出できる限り、他の細胞系も指示細胞として用いることができる。該細胞を、 κ B結合モチーフの1又は2以上の追加のコピーをコードする発現ベクター、好ましくは機能できるようにリポーター遺伝子に連結した発現ベクターを含有するように組換え技術を用いて修飾してもよい。該細胞を、I κ B α 及びNF- κ Bを発現するように修飾することもできる。好ましくは、NF- κ Bをコードする発現ベクターは、I κ B α が結合するNF- κ Bのp65サブユニットのコーディング領域を含有する。

20 【0025】該宿主細胞は、NF- κ Bを発現する組換えDNA、cDNA発現ライブラリー由来のキモトリプシン様遺伝子及びリポーター遺伝子に連結した κ Bモチーフにより修飾された酵母であってもよい。キモトリプシン様プロテアーゼの発現はI κ B分解及びNF- κ Bの活性化をもたらす。これからリポーター活性の誘発をもたらすであろう。該組成物の存在下では、キモトリプシン様プロテアーゼは阻害され、リポーター活性をもたらさないであろう。酵母リポーターの研究で典型的に用いられるマーカーの例には、 β -ガラクトシダーゼ（ β -gal）、HIS3及びLEU2栄養素選択マーカーが含まれる。

30 【0026】リポーター遺伝子は、NF- κ B活性化の刺激又は阻害を検出するのに表現型で同定することができるマーカーである。本発明で好ましく用いられるマーカーには、その発現がルシフェラーゼ検定法により検出可能であるLUC遺伝子が含まれる。原核細胞の発現ベクターで典型的に用いられるマーカーの例には、アンピシリン（ペニシリナーゼ）、テトラサイクリン及びクロラムフェニコール（クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ）に対する抗生物質耐性遺伝子が含まれる。本発明に好ましい哺乳動物発現ベクターで典型的に用いられる、かかるマーカーの例には、アデノシンデアミナーゼ（ADA）、アミノグリコシド・ホスホトランスフェラーゼ（neo, G418）、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）、ヒグロマイシン-B-ホスホ

トランスフェラーゼ (HPH)、チミジンキナーゼ (TK)、キサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ (XGPR T, g p t) 及び β -ガラクトシダーゼ (β -g a l) の遺伝子が含まれる。

【0027】組換えDNAを用いた宿主細胞の形質転換は、当業者に周知である慣用的方法により行うことができる。宿主が大腸菌の如き原核細胞である場合、DNA取り込み能力のあるコンピテント細胞を、指数増殖期後に採取し、続いて当該技術分野で周知の操作によりC a C l₂ 法によって処理した細胞から調製することができる。他に、M g C l₂ 又はR b C lを用いることもできる。形質転換は、宿主細胞のプロトプラストを形成した後に、又は、エレクトロポレーションにより行うこともできる。

【0028】宿主が真核細胞である場合、それは本発明のこの方法に好ましいのであるが、リン酸カルシウム共沈法；マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、リポソームに包まれたプラスミドの挿入の如き慣用的な機械的操作；又はウィルスベクターのような、DNAのトランスフェクション方法を用いることができる。真核細胞を、本発明のポリペプチドをコードするDNA配列、及び選択可能な表現型をコードする単純ヘルペスチミジンキナーゼ遺伝子の如き第2外来DNA分子を用いて同時に形質転換することもできる。他の方法は、真核細胞を一時的に感染又は形質転換して該タンパク質を発現させるために、シミアンウィルス40 (SV40) 又はウシパピローマウィルスの如き真核細胞性ウィルスベクターを用いることである (Eukaryotic Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratory, Gluzman e d., 1982)。

【0029】本発明では、 κ B結合モチーフポリヌクレオチド配列、好ましくは機能できるようにリポーター遺伝子に連結したI κ B α 及びNF- κ Bポリヌクレオチド配列を、組換え型発現ベクター内に挿入してもよい。“組換え型発現ベクター”とは、遺伝子配列の挿入又は組み込みにより操作されたプラスミド、ウィルス又は当該技術分野で知られている他のビヒクルのことをいう。かかる発現ベクターは、挿入された遺伝子配列の効率的な転写を促進する、その宿主のプロモーター配列を含有する。発現ベクターは、典型的には、複製起点とプロモーター、並びに形質転換細胞の表現型選択を可能にする特有の遺伝子を含有する。本発明で用いるのに適するベクターには、細菌内で発現するためのT7に基づく発現ベクター (ローゼンベルグ (Rosenberg) ら, Gene 56:125, 1987)、哺乳動物細胞内で発現するためのpMSXND発現ベクター (リー (Lee) 及びナタンズ (Nathans), J. Biol. Chem., 263:3521, 1988) 及び昆虫細胞内で発現するためのバキュロウィルス由来ベクターが含まれるが、これらに限定されない。このDNAセグメントは、調節要素、例えば、プロモーター (例えば、T7、メタ

ロチオネイン1、又は多角体プロモーター) に、機能できるように連結したベクター内に存在することができる。

【0030】本発明の方法におけるNF- κ B活性の検出は、リポーター遺伝子の遺伝子産物のレベルを測定することにより行われる。検出方法は、例えば、核酸分析、タンパク質分析、栄養素選択、又は酵素の検定法によるような免疫学的方法であってもよい。当業者には、他の普通の方法も知られていよう。他の態様において、本発明は、被験体におけるNF- κ B遺伝子活性化に関連する免疫異常障害を治療する方法を提供する。好ましくは、免疫異常障害はTNF、IL-1又はIL-6産生に関連している。この方法は、I κ B α を分解するキモトリプシン様セリンプロテアーゼの阻害物質を該被験体に治療有効量投与することを含む。“免疫異常障害”とは、免疫反応又は広く免疫を包含するあらゆる疾患のことをいう。ここで用いる場合、“治療有効量”とは、NF- κ B障害の原因を改善するのに充分な量の阻害物質の量のことをいう。“改善する”とは、この治療を受ける患者の障害の好ましくない作用を軽減することを含む。本発明の被験体は、好ましくはヒトであるが、NF- κ B障害を持つあらゆる動物、例えば、ヒト骨髄を移植したSCIDマウス (ヒト化SCID) が本発明の方法によって治療され得ると考えられる。本発明の方法によって治療され得る免疫異常障害の例には、後天性免疫不全症 (エイズ)、毒物ショック症候群、同種異系移植片拒絶反応、紫外線及び放射線反応、及び免疫反応中のT細胞、B細胞及びマクロファージの活性化に関連する障害及び急性期反応及び腫瘍壊死因子媒介悪液質の如き進行癌に関連する障害が含まれる。

【0031】本発明は、NF- κ Bトランス活性化に関連するウィルスの活性化を調節する方法であって、I κ B α を分解するキモトリプシン様セリンプロテアーゼの阻害物質を被験体に調節有効量投与することを含む方法を包含する。“調節する”とは、ウィルスの活性化を阻害するか又は刺激するかのいずれかをいう。NF- κ Bにより転移活性化されるあらゆるウィルス、例えば、ヒト免疫不全ウィルス (HIV) が含まれる。本質的には、NF- κ B/I κ B α と因果関係があるあらゆる疾患を治療することが可能であると考えられる。

【0032】本発明は、ペプチダルデヒドであるプロテアーゼの阻害物質を提供する。このペプチダルデヒドは、好ましくは式



〔式中、R₁ は任意のアミン保護基であり；Lはロイシンであり；R₂ は任意であるが式-(CH₂)_n-CH(NH₃⁺)-COO- (nは1~5で(CH₂)_n は分枝状又は直鎖状のアルキルである) を有し；そしてR₃ はメチオニンを除く任意の任意の疎水性アミノ酸である。〕を有する。アミン保護基は、好ましくはN-アセチル、

ベンジルオキシカルボニル又はブチルである。かかるペプチドアルデヒド阻害物質の例には、N-アセチル-L-*Leu-Leu*-ノロロイシナール (AcLLnL) 及びベンジルオキシカルボニル-L-*Leu-Leu*-フェニルアラニナール (ZLLF) の如きプロテオソーム阻害物質が含まれる。本発明の方法で阻害物質として有用な他のペプチドアルデヒドには、N-アセチル-Ala-L-*Leu-Leu*-ノロロイシナール (AcALLnL) が含まれる。最も好ましいのは、アミノ酸位置 R₃ が疎水性アミノ酸で置換されているペプチドアルデヒドである。R₃ の例には、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン及びフェニルアラニンが含まれる。最も好ましくないのは、R₃ が荷電したアミノ酸であるペプチドアルデヒドである。最も好ましくは、阻害物質は、ベンジルオキシカルボニル-L-*Leu-Leu*-フェニルアラニナール (ZLLF) である。

【0033】本発明の阻害物質は、注射により又は時間をかけて徐々に注入することにより非経口で投与することができる。該阻害物質は、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、洞内、経皮、又は体外投与することができる。該阻害物質を送達する方法には、マイクロスフェア又はプロテイド内への封入、肺へのエアロゾル送達による経口法、イオン導入法又は経皮的エレクトロポレーションによる経皮法が含まれる。他の投与方法は、当業者に知られているだろう。

【0034】本発明の阻害物質の非経口投与製剤には、無菌の水性又は非水性溶剤、懸濁剤、及び乳剤が含まれる。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油の如き植物油、及びオレイン酸エチルの如き注射可能な有機エステルである。水性の製剤上の担体には、生理食塩水及び緩衝媒質を含む、水、アルコール性/水性溶液、乳液又は懸濁液が含まれる。非経口用賦形剤には、塩化ナトリウム溶液、リンガーデキストロース、デキストロースと塩化ナトリウム、乳酸加リンガー液、又は固定油(fixed oil)が含まれる。静脈内用賦形剤には、液体及び栄養素補液、電解質補液(例えば、リンガーデキストロースを主成分とするもの)等が含まれる。例えば、抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤、及び不活性ガス等の如き保存剤及び他の添加物も存在してもよい。

【0035】他の態様においては、本発明は、I κ B α を分解するプロテアーゼを阻害するための医薬組成物であって、I κ B α を分解するキモトリプシン様セリンプロテアーゼの阻害物質を治療有効量含む組成物を提供する。この阻害物質は、好ましくはペプチドアルデヒドであり、式：



〔式中、R₁ は任意のアミン保護基であり；Lはロイシンであり；R₂ は任意であるが式-(CH₂)_n-CH

(NH₃⁺)COO- (nは1~5で(CH₂)_nは分枝状

又は直鎖状のアルキルである)を有し；そしてR₃ はメチオニンを除く任意の疎水性アミノ酸である。〕を有する。

【0036】好ましくは、R₃ は、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン及びフェニルアラニンからなる群から選ばれる。アミン保護基は、好ましくはN-アセチル、ベンジルオキシカルボニル及びブチルからなる群から選ばれる。本発明の医薬組成物に有用なペプチドアルデヒド阻害物質の例には、N-アセチル-L-*Leu-Leu*-ノロロイシナール (AcLLnL)、N-アセチル-Ala-L-*Leu-Leu*-ノロロイシナール (AcALLnL)、及びベンジルオキシカルボニル-L-*Leu-Leu*-フェニルアラニナール (ZLLF) が含まれる。該阻害物質の治療有効量は、I κ B α 分解を50%を越えて、好ましくは80%を越えて阻害する量である。

【0037】以下の実施例は、本発明を説明することを意図したものであって本発明を限定するものではない。それらは、使用されるかも知れないものの代表であり、当業者に知られている他の操作を代わりに用いてもよい。

【0038】

【実施例】次の実施例は、T細胞の活性化がI κ B α リン酸化をもたらすこと、及び、これが、適切なリンパ球同時刺激に依存する急速な生理的事象であることを示す。誘発性リン酸化が、幾つかの明確に異なるNF- κ B遮断試薬によって壊滅されるという事実は、活性化過程におけるその重要な役割を示している。主要な発見は、in vivo でのI κ B α リン酸化は、Rel複合体からそれを解離させるのではなく、I κ B α に、キモトリプシン様酵素によるタンパク質分解を受け易くさせるということである。

【0039】実施例1

NF- κ B活性化後のI κ B α の結末

種々のNF- κ B活性化刺激で細胞を処理した後のI κ B α の結末を調べた。70Z/3細胞を10%ウシ胎児血清及び50 μ M2-メルカプトエタノールを補充したRPMI-1640培地(ギブコ(Gibco)BRL)で培養した。約2.3 \times 10⁶の懸濁した細胞を含んだその2mlずつを、50ng/ml⁻²PMA(シグマ)、50U/mlIL-1 β (ベーリンガー・マンハイム)又は15 μ g/mlLPS(シグマ)で様々な時間処理した。HeLa細胞を10%ウシ胎児血清及び1%L-グルタミンを補充したDMEMで培養し、200U/mlの組換え型ヒトTNF α (ジェンザイム)で処理した。氷で冷やすことによって刺激を停止し、すぐにエッペンドルフ・マイクロフュージで5秒間細胞を遠心分離した。細胞沈殿物(10⁶細胞)を60 μ lの高濃度含塩(high-salt)抽出緩衝液で溶解した(バイエリー(Baerie)ら, Science, 242:540-546, 1988)。溶解産物の

上澄み液（エッペンドルフ・マイクロフュージで13,000rpm, 15分間遠心分離したものより）を、ウェスタンブロットリング及びザベル(Zabel)ら, EMBO J., 12:201, 1983 に記載された電気泳動移動度シフト検定法(EMSA)の両方による分析に用いた。SDS-PAGE及びウェスタンブロットリング用に、抽出物30 μ lずつを15 μ lのSDSサンプル緩衝液(シュレック(Schreck, R)ら, J. Exp. Med., 175:1181, 1992)と混合し、煮沸し、そして12.5%ポリアクリルアミドミニゲル(バイオラッド)でSDS-PAGEに付した。

【0040】半乾燥ブロットリング装置(バイオラッド)を用いて、15V/2.5mA/cm²で1時間、タンパク質をゲルからイモビロンTM(Immobilon TM)フィルター(0.45 μ m; ミリポア(Millipore))に移した。ブロットリング効率をボンセウス(Ponceau S)(セルバ(Serva))を用いたフィルターのタンパク質染色によって追跡した。0.1%(v/v) Tween-20(TBST)、5%スキンミルク粉末(ネッスル)及び1%BSAを含有する食塩加トリス緩衝液中でフィルターを一晩ブロックした。次いで、ブロック用緩衝液で1:100に希釈したI κ B α アフィニティカラムからの透析溶出液中で、このフィルターを抗I κ B α IgGと共に室温で1時間インキュベートした。TBST中で30分間洗浄した後、ヤギ抗ウサギ IgG/ホースラディッシュパーオキシダーゼ結合体(バイオラッド)をブロック用緩衝液を用いて1:4000に希釈した希釈液中で、このフィルターをインキュベートした。TBST中で30分間洗浄した後、このフィルターをECL検出試薬(アマシャム(Amersham))で処理してコダックXRフィルムに1分未満露光した。EMSA用には、100mM KCl、20mM HEPES(pH7.9)、2.5mMジチオスレイトール、0.5mMフッ化フェニルメチルスルホン(PMSF)、0.2%ノニデットP-40(Nonet P-40)、5%フィコール(Ficoll)、20 μ g BSA、3 μ g ポリ(dI-dC)及び10,000c.p.m.

(セレンコフ(Cerenkov)計数)の³²P標識二本鎖 κ Bオリゴヌクレオチドプローブ(ギブコBRL)を含有する結合混合物に抽出液2 μ lずつを添加した。タンパク質-DNA複合体の特異性は、RelAに対し特異的なポリクローナル抗体との免疫反応性により変動した。氷上での20分インキュベーション後に、サンプルを0.5 \times TBE中で天然4%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動に付した。乾燥したゲルをコダックXRフィルムに-70℃で一晩露光した。ヒトI κ B α を大腸菌内で産生させ、記載されているようにして精製した。大腸菌内で産生した6 \times Hisが付いた精製ヒトI κ B α (ザベルら, EMBO J., 前記文献; ヘンケル(Henkel)ら, Cell, 68:1121, 1992)をメーカーの説明書に従って0.5ml臭化シアン活性化セファロース4CL-B(ファルマシ

ア)とカップリングさせた。I κ B α に対して生じた2mlウサギ抗血清中の特異的IgG(ザベルら, 前記文献)をI κ B α -セファロースでアフィニティー精製した(ヘンケルら, 前記文献)。リン酸緩衝溶液及び2カラム容量の0.1Mグリシン-HCl(pH2.7)でよく洗浄した後、特異性抗体を2容量の4M塩酸グアニジウムで溶出した。溶出液を食塩加トリス緩衝液に対してよく透析して、ブロック用緩衝液で1:100に希釈してウェスタンブロットリングに用いた(ヘンケルら, 前記文献)。

【0041】細胞をPMAで所定時間処理した(図1a, レーン2~9)。全細胞抽出物中のタンパク質をSDS-PAGEにより分離してメンブランフィルター上に移した後、抗I κ B α IgGを用いてウェスタンブロットを行い、パーオキシダーゼ標識抗ウサギ IgGで上塗りした。矢印はI κ B α の位置を示す。図1bは、NF- κ BのDNA結合活性に対するPMAの作用を示す。コントロールからの全細胞抽出物(レーン1)及びPMA処理細胞(レーン2~6)を、マウス κ 軽鎖エンハンサーからのNF- κ B結合モチーフを包含する³²P標識DNAプローブと共にインキュベートした(セン(Sen)ら, Cell 47:921-928, 1986)後、電気泳動移動度シフト検定法(EMSA)を用いてDNA結合活性を分析した。天然ゲルのフルオログラムを示す。図2は、NF- κ Bの活性化及びI κ B α の安定性に対するIL-1 β 、LPS及びTNFの作用を示す。70Z/3細胞(上方及び中間のパネル)又はHeLa細胞(下方のパネル)をIL-1 β (レーン2~4)、LPS(レーン6~8)又はTNF α (レーン10~13)で所定時間処理した後、全細胞抽出物をNF- κ B-DNA複合体(塗り潰した矢印頭部)について分析した。未複合化DNAプローブの位置を中空の矢印頭部で示し、I κ B α 結合の位置を矢印で示してある。

【0042】未刺激70Z/3プレーB細胞からの抽出物では、ウェスタンブロットでI κ B α 特異性IgGにより単一の38Kバンドが検出された(図1a, レーン1)。これは、第2抗体単独では見られない。細胞培養物へのフォルボル-12-ミリスレート-13-アセテート(PMA)の添加後2~5分の間に、I κ B α は殆ど完全に細胞から消失した(図1a, レーン3と4を比較のこと)。この特異的免疫反応性は、40分後に再び現れた(図1a, レーン7)。I κ B α の消失は、全細胞抽出物中のNF- κ B-DNA結合活性の出現と同時に起こった(図1b, レーン2と3を比較のこと)。これは、これら2つの現象間の因果関係を示唆している。インターロイキン(IL-1 β)、リポ多糖類(LPS)及び腫瘍壊死因子 α (TNF α)は全て、70Z/3又はHeLa細胞においてI κ Bの減少を誘発しており(図2)、これは明確に相違する刺激が同じ反応を誘発したことを示すものである。PMA、TNF α 及び

IL-1 β での刺激5分後に殆どのI κ B α が既に減少してしまっているが、LPS刺激70Z/3細胞で刺激物質が急速に減少するまでに15分以上かかった。これら速度論的相違にも拘らず、I κ B α の減少はそれぞれの場合においてNF- κ B活性の出現と同時に起こった。他の研究(ブラウンら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90:2532, 1993)とは対照的に、ホスファターゼ阻害物質を細胞溶解緩衝液中に含めたときでさえも、種々の刺激による誘発後に、I κ B α の電気泳動移動度の一時的変化は現れなかった。更に、I κ B α の衰弱産物を検出することはできなかった。ポリクローナル抗体を用いたので、I κ B α のただ1つのエピトープだけが刺激で失われ又は修飾されたのではなさそうである。

【0043】実施例2

I κ B α の安定性へのタンパク質合成阻害物質の作用
70Z/3細胞を25 μ g/mlのシクロヘキサミド(シグマ)で処理した。このタンパク質合成阻害物質シクロヘキサミド(CHX)は、70Z/3細胞内でNF- κ Bを活性化する。10 μ g/mlでは、70Z/3細胞内でのタンパク質合成は90%に抑制される。細胞培養、抽出物試料、EMSA、SDS-PAGE及びウェスタンブロッティングは、実施例1に上記した通りであった。デンストメトリ走査をハウテック・スキャンマスター3(Howtek Scanmaster3)で行い、データをソフトウェアのクンティティ・ワン・バージョン2.2により解析した。

【0044】図3では、70Z/3細胞をシクロヘキサミド(CHX)で1時間処理した後、PMAで所定時間刺激した。全細胞抽出物をNF- κ B活性についてEMSAにより分析した(上方のパネル)。天然ゲルからのオートラジオグラムの切り取り部分を示す。塗り潰した矢印頭部がNF- κ B-DNA複合体の位置を示す。少量の細胞抽出物をI κ B α についてウェスタンブロッティングにより分析した(下方のパネル)。I κ B α バンドの位置を矢印で示す。図4は、タンパク質合成停止細胞内でのI κ B α の半減期を示す。細胞をCHXだけで処理するか(左側のパネル)又はCHXで1時間処理した後PMAで所定時間誘発した(右側のパネル)。タンパク質含量が等しい全細胞抽出物をウェスタンブロッティングによって分析した後、フルオログラムの38KI

I κ B α バンドをデンストメトリで定量した。CHX処理*

* 単独(左側のパネル; 中空三角)及びCHX処理後PMA刺激(右側のパネル; 塗り潰した三角)で検出されたI κ B α の量を半対数プロットで示す。点線はt_{1/2}値を概算するのに用いた傾きの一部分を示す。右側のパネルの点線は、左側のパネルで読み取ったPMA不存在下でのI κ B α の減少量を示す。

【0045】70Z/3細胞をCHXで1時間処理した後、NF- κ BのDNA結合を弱く誘発しただけ(図3, 上方のパネル, レーン1)では、有意なレベルのI κ B α が依然として存在した(下方のパネル)。このことは、I κ B α の正常な代謝回転速度を妨けても、NF- κ Bの急激な活性化には充分ではないことを示している。CHX処理細胞をPMAで刺激した場合、CHXの不存在下で認められたものと見分けがつかない速度で、I κ B α の急速な減少と更にNF- κ B結合活性の誘発が認められた(図3と図1aを比較のこと)。しかし、CHXは、PMA単独で処理40分後に見られるI κ B α の再出現を阻止した(図3と図1aを比較のこと)。このことは、I κ B α がNF- κ Bによる転写制御の下で新たに合成されるという知見と一致する。CHX処理70Z/3細胞内でI κ B α について約138分の半減期が確認された(図4)。タンパク質合成停止細胞をPMAで刺激すると、I κ B α の半減期はその最も速い減少期の間で僅か1.5分に低下した。このことは、PMAがI κ B α の半減期を2桁のオーダーで低下させたことを示している。

【0046】NF- κ Bの活性化についてのI κ B α の誘発性減少の機能的有意性を、細胞培養物を種々のプロテアーゼ阻害物質に曝すことによって試験した。キモトリプシン様特異性を有する6種の明らかに異なるセリンプロテアーゼ阻害物質は、PMA及びTNF α に応答してNF- κ B-DNA結合活性の誘発を効率よく阻止した(表1)。O₆t-1を含む構成DNA結合活性は影響を受けず、NF- κ B活性化を阻止する阻害物質濃度での色素排除試験及び位相差顕微鏡によっては有意な細胞死も認められなかった。ロイペプチン、アンチパイン及びトリプシン阻害物質であるトシル-Lys-メチルエステルは、高濃度でも有効ではなかった。

【0047】

【表1】

表 1

NF- κ Bの活性に対する種々のプロテアーゼ阻害物質の作用

プロテアーゼ阻害物質	ジャーカット	70Z/3
トシル-Phe-	20*	20
クロロメチルケトン (TPCK)		
ベンジルオキシカルボニル-Leu-	10	10
Tyr-クロロメチルケトン (2LYCK)		
トシル-Lys-	100	100

クロロメチルケトン (TLCK)
 3,4-ジクロロイソクマリン
 N-ベンゾイル-L-Tyr-
 エチルエステル (BTEE)
 N-アセチル-DL-Phe-
 β -ナフチルエステル (APNE)

20 ND
 1,000 ND
 200 200

【0048】ジャーカット及び70/3細胞培養物を、
 上掲の化合物と種々の濃度で30分間インキュベートし
 てから、TNF α (ジャーカット細胞)又はPMA (7
 0Z/3)のいずれかにより刺激した。全細胞又は核抽
 出物を調製してEMSAを用いてNF- κ B活性につい
 て分析した。

*IC₉₀ (μ M), 90%阻害濃度; ND, 測定せず。
 ジャーカットT細胞は記載された通りに培養した (シュ
 レックら, EMBO J., 10:2247, 1992)。全ての化合物
 (シグマ)は、DMSOに溶かして細胞を種々の濃度で
 30分間前処理した。EMSAは記載された通り行った
 (ヘンケルら, Cell, 68:1121, 1992)。

【0049】トシル-Phe-クロロメチルケトン (T
 PCK)の作用をより詳細に調べた。細胞培養物、抽出
 物試料、EMSA、SDS-PAGE及びウェスタンブ
 ロットは上記の通りであった。70Z/3細胞
 を、ジメチルスルホキシド (DMSO)に溶かした25
 μ M TPCK又はTLCK (シグマ)で前処理した。
 コントロール培養物には、等量のDMSOを加えた。細
 胞培養物をPDTC (シグマ)のアンモニウム塩で処理
 した。

【0050】図5aは、NF- κ Bの活性化及びI κ B
 α の安定性に対するTPCKの作用を示す。25 μ M
 TPCKの存在下 (1時間前処理)又は不存在下 (左側
 のパネル)で、70Z/3細胞をPMAで所定時間刺激
 した。細胞抽出物をNF- κ B活性についてEMSA

(上方のパネル)により分析し、I κ B α レベルについ
 てウェスタンブロット (下方のパネル)により分
 析した。矢印は、ウェスタンブロットにおける38K I
 κ B α バンドを示している。下方の微かなバンドは、ア
 フィニティー精製した抗体を用いるとその存在量が大き
 く減少するので、非特異的である。フルオログラムの切
 り取り部分のNF- κ B-DNA複合体の位置は、塗り
 潰した矢印頭部により示してある。図5bは、70Z/

3細胞及びコントロール細胞 (Co)内におけるIL-
 1 β 、LPS及びPMAによるNF- κ Bの活性化に対
 するTPCKの作用を示す。細胞を刺激前にTPCKで
 10分間処理するか (レーン6~8)、又は細胞をIL-
 1 (I)及びPMA (P)で30分間、及びLPS

(L)で60分間処理した後にTPCKで10分間処理
 した (レーン10~12)。コントロールからの全細胞
 抽出物 (レーン1~4)及びTPCK処理細胞 (レーン
 5~12)をNF- κ B活性についてEMSAにより分

析した。図5cは、PMAによるNF- κ Bの活性化に
 対するTLCKの作用を示す。70Z/3細胞を未処理
 のままにするか (レーン1)又は25 μ M TPCK (レ
 ーン2)若しくは25 μ M TLCK (レーン3)のい
 ずれかで10分間処理した後にPMAを添加した。細胞
 抽出物をNF- κ B活性についてEMSAにより分析し
 た。図6は、抗酸化剤PDTCの作用を示す。100 μ
 M PDTCを刺激前1時間に添加するか又はPDTCの
 不存在下で、細胞をPMAで所定時間刺激した。細胞抽
 出物をNF- κ B活性についてEMSAにより分析し
 (上方のパネル)、I κ B α レベルについてウェスタン
 ブロットにより分析した (下方のパネル)。

【0051】25 μ M TPCKで細胞を処理すると、
 PMAに応答してNF- κ B活性の誘発を阻害し (図5
 a, 上方のパネル)並びにI κ B α の減少を阻害する
 (下方のパネル)。TPCKの半最大阻害濃度 (I
 C₉₀)は約8 μ Mであった。このプロテアーゼ阻害物質
 は、70Z/3細胞内でIL-1 β 及びLPSによるNF- κ B
 の活性化を阻止し (図5b, レーン6及び
 7)、他の種々の細胞系でTNF α によるNF- κ Bの
 活性化を阻止した。TPCKは、PMA、IL-1又は
 LPSで刺激した後に添加した場合は、NF- κ B活性
 を強く妨げることはないが、該因子の更なる活性化を停
 止するようにみえる (図5b, レーン10及び12)。
 TPCKは、IL-1及びTNF α がPMA誘導性PC
 Kアイソザイムから独立してNF- κ Bを活性化するの
 で、タンパク質キナーゼC (PKC)に作用しなかった
 ようである (ボムスジック (Bomsztyk)ら, Cell. Regu
 l., 2:329, 1991; シュレックら, J. Biol. Chem., 26
 5:8339, 1990)。更に、TPCKは、TNFレセプター
 の初期信号行動を妨げなかった。構造及び化学的活性に
 おいてTPCKに高度に関連するトリプシン様セリン
 プロテアーゼの阻害物質であるTLCKは、25 μ Mの濃
 度ではNF- κ Bの活性化を阻止できず (図5c, レ
 ーン3)、100 μ Mで阻止できたに過ぎない (表1)。
 この薬学的データは、NF- κ Bの活性化にはI κ B α
 のタンパク質分解が必要であることを強く支持してい
 る。この阻害物質プロフィールは、キモトリプシン様特
 異性を有するセリンプロテアーゼの関与を示唆する。本
 発明者らは、このセリンプロテアーゼをI κ B α プロテ
 アーゼということにする。プロテアーゼ阻害物質がI κ
 B α プロテアーゼから上流に位置する他のタンパク質分
 解段階を妨害するということを除くことはできないが、

これは、恐らく共通して上流には殆ど経路を持たないかも知れないNF- κ B活性化因子の多様性から見て、ありそうもないと思われる。

【0052】反応性酸素中間体(ROI)は、多くの誘発条件によってNF- κ Bの活性化における伝令としての役割を果たすように思われる。NF- κ B活性化の強力な抗酸化性阻害物質は、ピロリジンジチオカルバメート(PDTC)である。100 μ M PDTCで前処理した70Z/3細胞内では、PMAで刺激した後に有意なI κ B α の減少又はNF- κ Bの活性化が見られなかった(図6)。このことは、I κ B α のタンパク質分解がROIにより制御されることを示唆している。PDTCは、PMA誘発膜結合及びPKCのキナーゼ活性を妨害しないので、これは無傷細胞内でのPKCによるI κ B α の直接リン酸化に反対の議論を持ち出すものである。

【0053】実施例3

ジャーカット細胞内でのNF- κ B活性化は同時刺激を必要とする

そしてI κ B α のリン酸化と分解を包含する

Tリンパ球の生理的活性化は、TCR/CD3レセプター及びCD28による同時刺激を必要とするが(フレイザー(Fraser, J.D.)ら, Immunol. Today, 14:357-362, 1993; リンスレイ(Linsley, P.S.)ら, Annu. Rev. Immunol., 11:191-212, 1993; ウムラウフ(Umlauf, S.W.)ら, Immunol. Rev., 133:177-197, 1993)、これは1種のレセプター又はCa⁺⁺イオノファを加えた最適以下のPMA濃度によって模倣することができる(フレイザーら, 前記文献; リンスレイら, 前記文献; ウムラウフら, 前記文献; クラプトリー(Crabtree, G.R.), Science, 243:355-361, 1989; スウ(Su, B)ら, Cell, 77:727-736, 1994)。先の研究では、NF- κ B活性化は同時刺激によって高められることが示されている(セン(Sen, R.)ら, Cell, 47:921-928, 1986; レナルド(Lenardo, M.J.)ら, Cell, 58:227-229, 1989; マチーラ(Mattila, P.S.)ら, EMBO J., 9:4425-4433, 1990; フランツ(Frantz, B)ら, EMBO J., 13:861-870, 1994)。

【0054】NF- κ Bの活性化に関連する段階には、核DNA結合活性及び転写活性の出現によるI κ B α の脱離が含まれる。NF- κ B活性化を、HIV Tatタンパク質と共同してNF- κ Bにより大きく制御されるHIV-LTRプロモーターのリポーター活性により測定した(ナーベル(Nabel, G.)ら, Nature, 326:711-713, 1987)。ジャーカット細胞を次の試薬で刺激した:

(P), PMA (フォルボール-12-ミリステート13-アセテート), 10 ng/ml; (I), A23187 Ca⁺⁺イオノファ, 1 μ M; (3), 抗CD3 (OKT3), 5 μ g/ml; (28) 抗CD28 (モノクローナル抗体9.3), 3 μ g/ml; (P/I), I κ B α をトランスフェクトしたジャーカット細胞にP

MA+Ca⁺⁺イオノファ; (NS) 刺激せず(0.1%, DMSOのみ)。ジャーカット細胞をエレクトロポレーションにより(スウら, 前記文献)1 μ g HIV-LTR-LUC (イスラエル(Israel, S)ら, Gene, 104:139-145, 1991)及び4 μ g PBC-TATでトランスフェクトした。コントロール培養物は、8 μ g R α -CMV-I κ B α (ザベルら, EMBO J., 12:201-211, 1993)で同時トランスフェクトした。トランスフェクション30時間後、この細胞を8時間刺激して、プロメガ(Promega) ルシフェラーゼ検定系を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

【0055】ベッグらの前記文献に本質的に従って、細胞レベル以下のタンパク質抽出物を調製した。ジャーカット細胞を20分間刺激した後、細胞質溶出物(50 μ g/ポイント)をウェスタンブロットにより分析し、核抽出物(5 μ g/ポイント)を記載された通りに(ヘンケル(Henkel, T.)ら, Nature, 365:182-185, 1993) EMSAにより分析した。

【0056】ウサギ抗I κ B α をGST-I κ B α 融合タンパク質に対して標準的方法により調製した。この抗体の特異性は、組換え型I κ B α タンパク質を用いる競合検定法で確認した。図7は、Ca⁺⁺イオノファは、単独でも、CD3又はCD28のいずれかと連結してもリポーター活性を誘発しないが、PMAは単独で10 ng/mlで僅か2倍だけ基底活性(basal activity)を高めたことを示す。一方、PMAと可溶性抗CD3抗体、可溶性抗CD28抗体又はCa⁺⁺イオノファとの組み合わせは、リポーター活性を4~9倍だけ高めた(図7a)。HIVプロモーターの同時刺激活性は、リポータープラスミドで同時トランスフェクトされたI κ B α の過剰発現によりそれが完全に遮断されたという知見により証明されるように、明らかにNF- κ B依存性であった(図7a, \$/P/I)。

【0057】同時刺激がNF- κ Bの必要条件であることも、電気泳動移動度シフト検定法(EMSA)で明白である(図7b)。EMSAの上方の切り取り部分は、RelA(p65)とNF- κ B(p50)から構成されるNF- κ B複合体(矢印)を示す。単一刺激がEMSAにおいてNF- κ B活性を誘発するのにほとんど充分ではないのに反して、PMAとCa⁺⁺イオノファ、抗CD3又は抗CD28のいずれかとの組み合わせ及びこれら2種の抗体での同時刺激は、NF- κ B-DNA結合活性を、単一刺激で誘発されたレベルの10~20倍に高めた(図7b)。

【0058】NF- κ B活性に並行して、細胞を種々の刺激で処理した後のI κ B α の結末を調べた。NF- κ Bを活性化できなかった単一刺激は、ウェスタンブロットにおいてI κ B α シグナルの移動度又は強度に影響を及ぼさなかった。ジャーカット細胞は、図7aにおけるように所定の刺激で8分間処理した。対照的に、T細胞

同時刺激は $I\kappa B\alpha$ シグナルの強度を低下させ、遅移動型の $I\kappa B\alpha$ の出現をもたらした (図 7 c)。刺激した細胞からの細胞質ゾル抽出物をアリカリ性ホスファターゼで処理すると、この新規な $I\kappa B\alpha$ バンドの遅移動性を逆転させた。これは、それが $I\kappa B\alpha$ のリン酸化型であったことを示している。矢印は $I\kappa B\alpha$ 未修飾バンドを示す。低分子量の非特異的バンドが、プロットの底部に現れているが、細胞刺激によって影響されないものである。

【0059】実施例 4

$I\kappa B\alpha$ リン酸化の阻害はその誘発性分解を遮断する
実施例 3 の結果に基づけば、 $I\kappa B\alpha$ のリン酸化は、NF- κB 活性化と並行して、T 細胞活性化の生理的要求に従って誘発される。細胞刺激及び抽出物調製は上記の通りである。ジャーカット細胞を $25\mu M$ TPC K (ベーリンガー) 若しくは $400 ng/ml$ CsA (サンド) で 30 分間、又は $100\mu M$ PDT C (シグマ) で 1 時間、刺激前に処理した。PMA ($10 ng/ml$) 及び Ca^{++} イオノファ ($1\mu M$) でのジャーカット細胞刺激時間は、ウェスタンブロット分析により決定した。 $I\kappa B\alpha$ 矢印は未修飾 $I\kappa B\alpha$ の位置を示し、* 矢印は修飾型 $I\kappa B\alpha$ の位置を示している。PMA 及び Ca^{++} イオノファでのジャーカット刺激時間は示した通りである。

【0060】 $I\kappa B\alpha$ 修飾過程の速度論的研究により、リン酸化 $I\kappa B\alpha$ の出現に伴って、未修飾 $I\kappa B\alpha$ バンドが少なくなることが明らかになった (図 8 a)。デンストメトリ分析で、これら 2 つの $I\kappa B\alpha$ シグナルは、刺激後 7 分で未刺激細胞からの単一 $I\kappa B\alpha$ シグナルと等しくなった。同じように、7 分と 9 分の間で、リン酸化 $I\kappa B\alpha$ シグナルの強度は、未修飾バンドの連続的なシグナル損失と等しくなった (図 8 a)。これら特徴は、未リン酸化 $I\kappa B\alpha$ シグナルの減少はその修飾に続いて起こること、及びリン酸化バンドの減少は分解によるものであることを示している。

【0061】 $I\kappa B\alpha$ 分解がその先行するリン酸化を必要とするという仮定を試験するために、NF- κB 活性を遮断することが分かっている次の 3 種の異なる試薬を用いた：トシル- Ph -クロロメチルケトン (TPC K) (ヘンケルら、前記文献)、ピロリジンジエチルカルバメート (PDT C) (ヘンケルら、前記文献；シュレックら、J. Exp. Med., 175:1181-1194, 1992；サン (Sun, S.C.) ら、Science, 259:1912-1915, 1993) 及びサイクロスポリン A (CsA) (スウら、前記文献)。

【0062】セリンプロテアーゼ阻害物質である TPC K と強力な抗酸化剤である PDT C は、誘発性修飾及び $I\kappa B\alpha$ の分解のいずれをも完全に遮断した (図 8 b)。協力な免疫抑制剤でありホスファターゼ・カルシニューリンの阻害物質であるサイクロスポリン A (シュリバー (Schriber, S.L.), Cell, 70:365-368, 1992)

は、殆どの誘発性 $I\kappa B\alpha$ のリン酸化及び分解が起こらないようにした (図 8 b)。刺激前に CsA で処理した細胞内の $I\kappa B\alpha$ のリン酸化は低率で開始され、20 分間の分析の間に僅かに増えただけであった。3 種全ての試薬それぞれがその個別的作用様式で、誘発性 $I\kappa B\alpha$ 修飾とその分解のいずれをも遮断したという事実は、リン酸化が $I\kappa B\alpha$ 分解の前提条件であることを示している。

【0063】実施例 5

10 $I\kappa B\alpha$ リン酸化は NF- κB 活性化には充分ではない
 $I\kappa B\alpha$ の安定性が Rel A (p 65) と複合化することにより高められることが示されたので、 $I\kappa B\alpha$ の修飾はその解離と不安定化をもたらすことが示唆された (サンら、前記文献, 1993；スコット (Scott, M.L.) ら、Genes & Dev., 7:1266-1276, 1993；ライス (Rice, N.R.), EMBO J., 12:4685-4695, 1993；チャウ (Chiao, P.J.) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91:28-32, 1994)。 $I\kappa B\alpha$ リン酸化により解離が誘発されると、放出された Rel タンパク質は自由に核に移行でき、その κB 部位に結合するであろう。放出された $I\kappa B\alpha$ のその後の分解は、この解離段階を完全なものにしてその不可逆性を確実にするであろう。先の実施例 (1 及び 2) では、 $I\kappa B\alpha$ プロテアーゼを、キモトリプシンに関連すると考えられるセリンプロテアーゼとして予備的に特徴付けをした (ヘンケルら、前記文献)。刺激後に $I\kappa B\alpha$ を除去できる候補の細胞質プロテアーゼは、明確に異なるキモトリプシン様活性を有し、至るところに存在する 700 kD の多サブユニットプロテオソームである (ビニトスキイら、Biochemistry, 31:9421-9428 (1992))。

30 【0064】N-アセチル-L- Leu - Leu -ノルロイシナール (AcLLnL) は、翻訳後の修飾行動の妨げになりそうにない、可逆的な非アルキル化プロテオソーム阻害物質である。従って、 $I\kappa B\alpha$ プロセシングに対する AcLLnL の作用を検討した。
10 mM KC1、プロテアーゼ及びホスファターゼ阻害物質を含有する $200\mu l$ の HePes 緩衝液 ($20 mM$, pH 7.6) (スウら、前記文献) 中で、 $500\mu g$ の細胞質ゾル抽出物を $3\mu l$ 抗血清と共にインキュベートすることにより免疫沈降 (IP) を行った。 $0^{\circ}C$ で 18 時間インキュベーションした後、免疫沈降物をプロテイン A セファロースビーズから回収して抗 $I\kappa B\alpha$ を用いたウェスタンブロット分析に付した。抗 Rel A 血清は、Rel A の C-末端部分に対して調製されたウサギポリクローナル抗血清であった。図 9 a では、細胞を $50\mu g/ml$ AcLLnL で 4 時間前処理し、PMA ($10 ng/ml$) 及び Ca^{++} イオノファ ($1\mu M$) で所定の時間間隔で刺激し、そしてウェスタンブロットにより分析した。矢印は、未修飾 $I\kappa B\alpha$ を示す。この実施例で用いた AcLLnL 及び他のペプチドアルデヒドは、当該技

術分野で知られている標準的方法によって合成した。

【0065】プロテオソーム阻害物質、つまりAcLLnLでのジャーカット細胞の前処理はIκBαリン酸化を妨げなかったが、IκBα分解を完全に遮断した(図9a)。2つの型のIκBαの割合に幾つかの変化が認められると共に、リン酸化型が蓄積して細胞刺激後20分にはピークに達した。それにも拘らず、デンストメトリ分析により確認したところでは、これら2つの型の合計は一定のままであった。

【0066】刺激後の時間が長い2ポイントに対応する核抽出物をNF-κB活性に対するAcLLnLの作用について試験した(図9b)。図9bには、AcLLnLの存在下(+)又は不存在下(-)での刺激時間を示した。このEMSAオートラジオグラムの上方の切り取り部分では、矢印はNF-κB複合体を示している。プロテアーゼ阻害物質の存在下では、殆ど全ての誘発性NF-κB活性が、IκBαのリン酸化状態に関係なく無くなってしまった。このことから、IκBαリン酸化それ自体はNF-κBが核へ移行できるようにするには充分ではなく、そのタンパク質の分解的除去を伴わなければならない。

【0067】特定の理論に拘束されることを欲しないが、これら結果は2つの異なるモデルによって説明されよう。第1のモデルは、リン酸化依存性IκBα-Re1A解離及びその後のIκBαの不安定化を伴い、IκBαの再会合を阻止するタンパク質分解が付随するというものである。もしそうであれば、活性化した細胞内で、細胞質複合体がリン酸化IκBα及びRe1Aを含有するとは考えられないであろう。一方、リン酸化は、タンパク質分解のためにIκBαを標識しようとすればできる。その場合、Re1Aとリン酸化されているが無傷のIκBαとを含有する一時的な複合体が検出され得る筈である。

【0068】Re1A複合体の組成を、抗Re1A血清(図9c, レーン4)又はコントロール血清(図9c, レーン3)で免疫沈降した後に抗IκBαでウェスタンブロット分析することにより評価した。図9cは、IκBαリン酸化がRe1複合体からそれを解離させないことを示している。レーン2と4は抗Re1A血清との免疫沈降物(IP)を示し; レーン3はコントロール抗cAb1血清との免疫沈降物を示し; レーン1と5はそれぞれ図7aからの7分ポイントと図9aからの30分ポイントに対応する(免疫沈降前の)参考ポイントである。ホスファターゼ阻害物質の存在下では、抗Re1Aを用いた刺激後早い時点からの細胞質抽出物を18時間免疫沈降することにより、Re1Aとの複合体中に等量のリン酸化及び未リン酸化IκBαが回収された。類似の結果が、他の抗Re1A血清で得られた(ビントスキイら, 前記文献)。AcLLnLの存在下では、刺激後の遅い時期(図9c, レーン2)又は早い時期からのR

e1A免疫複合体が、無傷リン酸化IκBαを含有した。従って、Re1AへのIκBαの親和性は、その誘発されたリン酸化後に低下することはない。Re1Aと修飾IκBα間の複合体は、それが細胞のタンパク質分解機構を受けない限り存続する(図9, a+c)。

【0069】実施例6

ペプチドアルデヒドによるIκBα分解の阻害

実施例5における結果は、ペプチドアルデヒド、つまりAcLLnLが、IκBα分解を効率よく阻害することを示した。従って、他のペプチドアルデヒドをIκBα分解の阻害について試験した。

【0070】ヒトHeLaS3又はHepG2細胞を、TNFα(20ng/ml)、IL-1(20ng/ml)又はPMA(100μg/ml)のいずれかで刺激する前に所定のペプチドアルデヒドで前処理した。この細胞を誘発後20分して採取し、IκBα分解の程度をIκBα特異性抗血清を用いてウェスタンブロット分析によって試験した。図10に、NF-κBを活性化する種々の物質によって誘発される、IκBα分解を遮断する関連ペプチドアルデヒドの能力をまとめた。(++)は85%を越える阻害を示し、(++)は60%を越える阻害を示し、(-)はIκBα分解の阻害が認められなかったことを示す。

【0071】ベンジルオキシカルボニル-Leu-Leu-フェニルアラニナル(ZLLF)は、IκBαのタンパク質分解の最も強力な阻害物質であり、その次にAcLLnL及びAcALLnLが続く。3番目のアミノ酸をメチオニン又はアルギニンで置換すると、IκBα分解を阻害できなかった。

【0072】実施例7

ペプチドアルデヒドはNF-κB依存性プロモーターからの転写をin vivo で阻害する

ペプチドアルデヒドであるAcLLnLを、NF-κB依存性プロモーターからの転写の阻害についてin vivo で試験した。ヒトHepG2細胞を2X κB-LUC(J16-LUC)又はRSV-LUC(10μg/0.5×10⁷細胞)でエレクトロポレーションした(220V, 960μF)。エレクトロポレーション後22時間たってから、細胞を所定のペプチドアルデヒド(200μM)で3時間処理し、そして所定のTNFα(20ng/ml)で刺激した。次いで、細胞を誘発後6時間で採取してルシフェラーゼ活性のレベルを測定した。図11はその結果を示す。

【0073】この実験は、AcLLnLがκB依存性プロモーターの転写をin vivo で選択的に阻害することを証明するものである。更に、関連ペプチドアルデヒドであるAcLLRは、κB依存性転写活性化に対して作用を有さなかった。

【0074】実施例8

ペプチドアルデヒドプロテオソーム阻害物質Z-LLF

CHO

及びAcLLnLCHOに対するNF-κB DNA結合及びIκBα分解の用量応答

2つのペプチドアルデヒド（1つはフェニルアラニン置換（ZLLF）を有し1つはノルロイシナル（AcLLnL）を有する）を、用量応答検定法でNF-κB DNA結合について試験した。

【0075】HeLa細胞を所定の濃度のペプチドアルデヒド阻害物質で5時間前処理するか又は未処理のままとし、次いでTNFα（15 ng/ml）で20分間刺激した。次いで、細胞を全細胞抽出物試料用に採取した。抽出物をNF-κB DNA結合活性について、電気泳動移動度シフト検定法（EMSA）により分析し、相対IκBαタンパク質レベルを、図12に示すように、ウェスタンブロット分析により測定した。

【0076】この結果は、AcLLnL及びZLLFは、1 μM～200 μMの濃度でTNFα誘発NF-κB活性を用量-依存的に阻害したことを示す。同じく、IκBα分解は、該ペプチドアルデヒドの存在下で最小であった。

【0077】図12の下方の挿入部は、EMSA及びウェスタンブロットのデンストメトリ走査により測定したZLLF及びAcLLnLについてのIC₅₀を示す。ZLLFのIC₅₀は3.4 μMであり、AcLLnLについてのIC₅₀は12.1 μMであった。従って、誘発性IκBαリン酸化の最終的な役割は、最も起こりそうなこととしては、分解のためにIκBαに標識を付けることであるだろう。プロテオソームの如き細胞質プロテアーゼは、Rel複体内の標識されたIκBαを認識してそれを分解するのであろう。上に述べた事柄は、本発明を説明するためのものであって、本発明の範囲を限定するものではない。事実、当業者は、法外な実験をすることなく、本明細書に記載した技術に基づいて、容易に更なる態様を想像及び作りだすことができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1aは、70Z/3プレB細胞内のIκBαに対するフォルボール-12-ミリスレート-13-アセテート（PMA）処理の作用のウェスタンブロット分析を示す。図1bは、マウスκ軽鎖エンハンサーのNF-κB結合モチーフを包含する³²P標識DNAをプローブにしたPMA処理70Z/3プレB細胞からのDNAのオートラジオグラムを示す。

【図2】70Z/3細胞及びHeLa細胞におけるNF-κBの活性化及びIκBαの安定性に対するIL-1、LPS及びTNF処理の作用を示す。ウェスタンブロット及びEMSA（天然ゲルからのフルオログラム）を示す。

【図3】PMA刺激後の70Z/3細胞におけるIκBαの安定性及びNF-κBの活性化に対するシクロヘキサミドの作用のEMSA（上方のパネル）及びウェスタ

ンブロット（下方のパネル）を示す。

【図4】シクロヘキサミド単独で処理（左側のパネル）又はシクロヘキサミドで1時間前処理した後に所定時間PMAで処理（右側のパネル）した細胞のウェスタンブロット分析後のIκBαデンストメトリでの定量を示す。

【図5】図5aは、70Z/3細胞におけるNF-κBの活性化及びIκBαの安定性に対するPMAによる誘発でのp-トシル-L-フェニルアラニクロロメチルケトン（TPCK）の作用を示す。図5b及びcは、70Z/3細胞におけるIL-1、LPS及びPMAによるNF-κBの活性化へのTPCKの作用を示す。

【図6】70Z/3細胞におけるNF-κBの活性化及びIκBαの安定性に対するピロリジンジチオカルバメート（PDTC）の作用を示す。

【図7】図7aは、HIV-LTR-Luc活性により測定したNF-κB活性を示す。ジャーカット細胞を次の試薬で刺激した：（P），PMA（フォルボール-12-ミリスレート-13-アセテート），10 ng/ml；（I），A23187Ca⁺⁺イオノファ，1 μM；（3），抗CD3（OKT3），5 μg/ml；（28）抗CD28（モノクローナル抗体9.3），3 μg/ml；（P/I），IκBαをトランスフェクトしたジャーカット細胞にPMA+Ca⁺⁺イオノファ；（NS）刺激せず（0.1%，DMSOのみ）。図7bは、NF-κB活性への種々の刺激の作用の電気泳動移動度シフト検定法（EMSA）を示す。図7cは、種々の刺激を細胞に与えた後のIκBαのリン酸化を示すウェスタンブロットである。

【図8】図8aは、PMA+Ca⁺⁺イオノファ（P/I）刺激後のIκBαの修飾の速度を示す。図8bは、NF-κB遮断物質であるTPCK、PDTC及びCsAで細胞を処理した後のIκBα分解を示す。

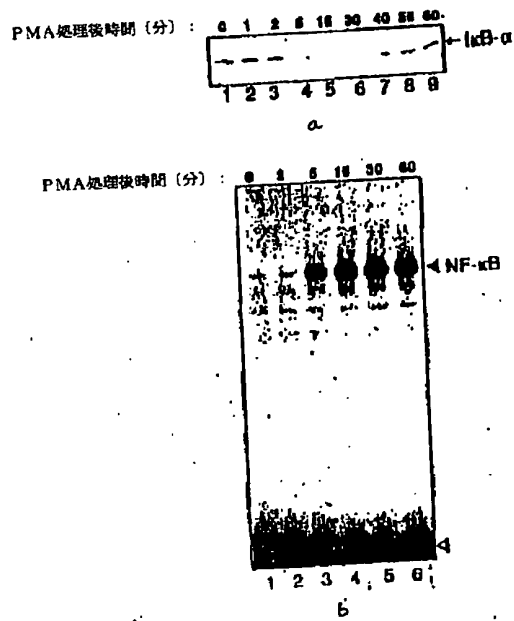
【図9】図9aは、N-アセチル-L-Leu-Leu-ノルロイシナル（AcLLnL）で処理した細胞のEMSA及びIκBαリン酸化及び分解への作用を示す。図9bは、AcLLnL処理後の数時点のEMSA及びNF-κB活性への作用を示す。図9cは、細胞のAcLLnL処理後のRelA及びIκBαの免疫沈降のウェスタンブロット分析を示す。

【図10】細胞のTNFα、IL-1又はPMA刺激後のIκBα分解への種々のペプチドアルデヒド阻害物質の作用を示す。

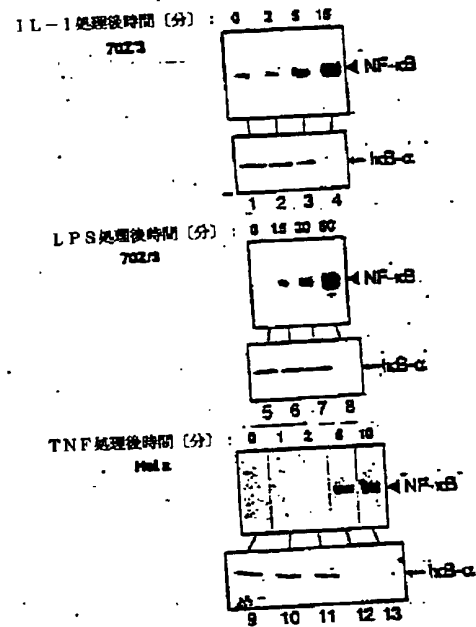
【図11】NF-κBプロモーターへの種々のペプチドアルデヒド阻害物質の作用を示す。

【図12】ベンジルオキシカルボニル-L-Leu-Leu-フェニルアラニナル（ZLLF）及びAcLLnLのNF-κB DNA結合及びIκBα分解の用量-応答のEMSA及びウェスタンブロットを示す。

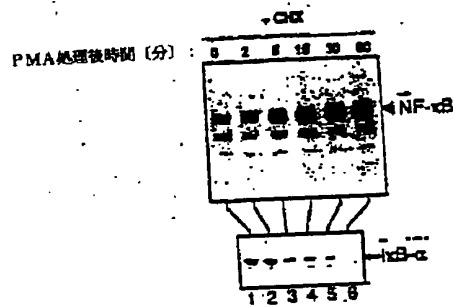
【図1】



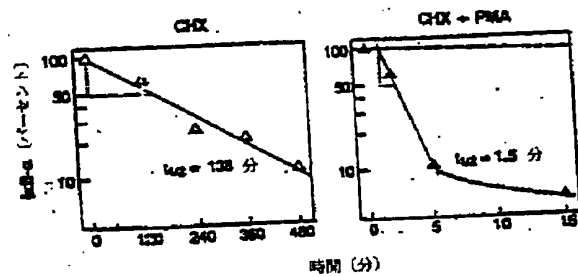
【図2】



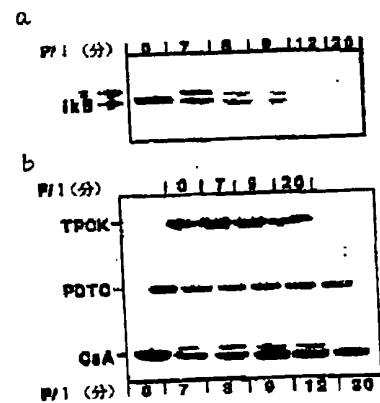
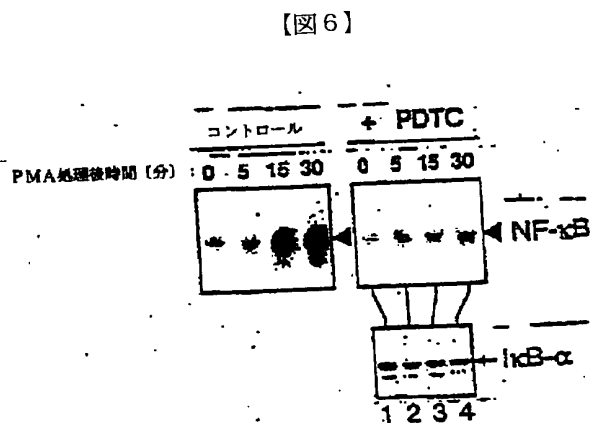
【図3】



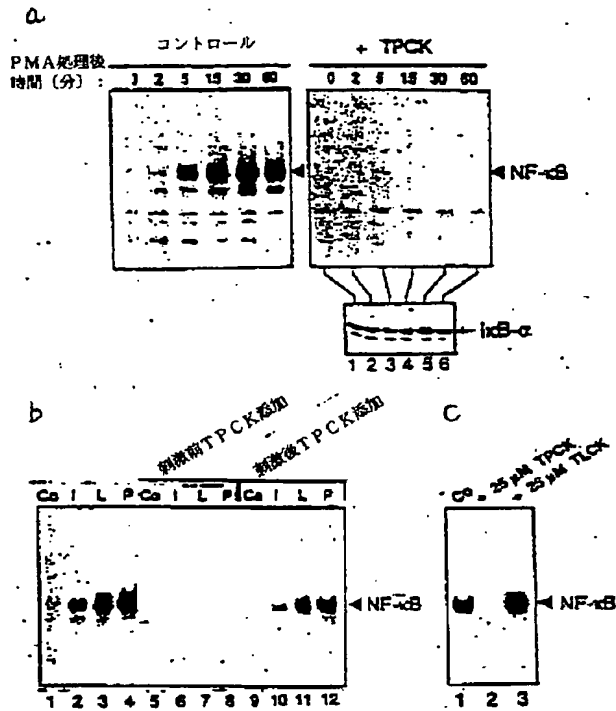
【図4】



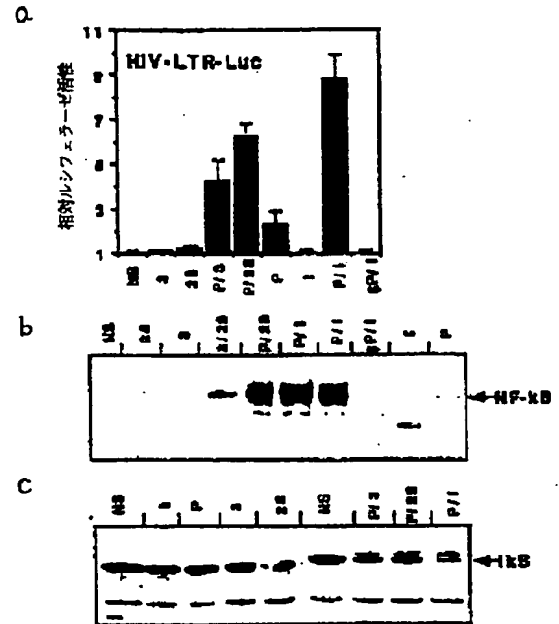
【図8】



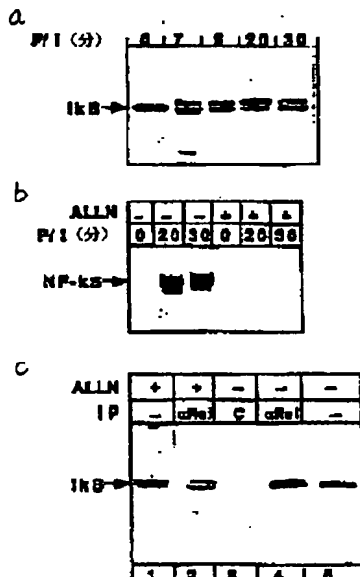
【図5】



【図7】



【図9】



【図10】

1κBα分解の誘発物質

ペプチダルデヒド 阻害物質	TNFα	IL-1α	PMA
Z-LLF-CHO	+++	+++	+++
Ac-LLnL-CHO	++	++	++
Ac-ALLnL-CHO	++	++	++
Ac-LLM-CHO	—	—	—
Ac-LLR-CHO	—	—	—
Z-IEL-CHO	—	—	—

Z-LLF-CHO: (N-7496-Leu-Leu-7x2675-Di-2-NH₂)

Ac-LLnL-CHO: N-7496-Leu-Leu-1801-Di-2-NH₂

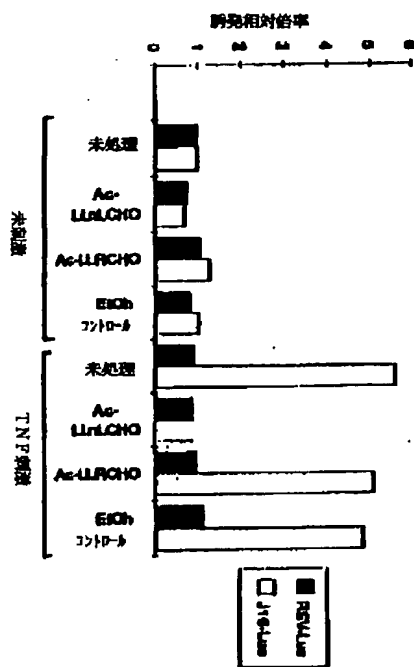
Ac-ALLnL-CHO: N-7496-Ala-Leu-Leu-1801-Di-2-NH₂

Ac-LLM-CHO: N-7496-Leu-Leu-1812-Di-2-NH₂

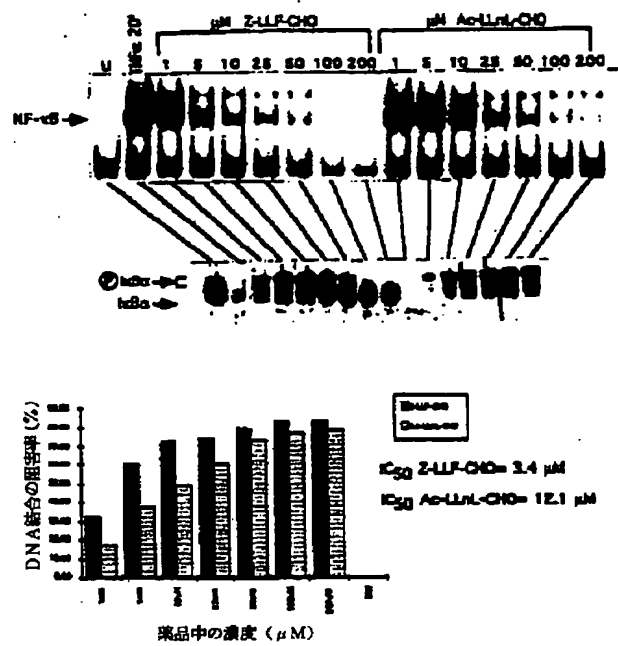
Ac-LLR-CHO: N-7496-Leu-Leu-7497-Di-2-NH₂

Z-IEL-CHO: (N-7496-Ile-Glu-Di-2-NH₂)

【図 11】



【図 12】



フロントページの続き

(72)発明者 イノン ベン・ネリア
 イスラエル国 90805 メヴァセレット
 ズィオン ピー. オー. ビー 1691, メ
 ヴォ ドゥヴデヴァン 5

(72)発明者 イリット アルカレイ
 イスラエル国 ギヴァット ゼーヴ, シ
 エヴェット ビニアミン ストリート 40

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.